

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/035101 A1(51) 国際特許分類⁷: A61L 27/56, C12M 3/00, C12N 5/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011471

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 9 日 (09.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-263126 2002 年 9 月 9 日 (09.09.2002) JP

特願2002-377780

2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002) JP

特願2003-289744 2003 年 8 月 8 日 (08.08.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP). 株式会社ジーシー (GC CORPORATION) [JP/JP]; 〒174-8585 東京都板橋区蓮沼町7番1号 Tokyo (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丹羽 英夫 (NIWA, Hideo) [JP/JP]; 〒674-0084 兵庫県明石市魚住町西岡2568-3 Hyogo (JP). 福地 健 (FUKUCHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒651-1233 兵庫県神戸市北区日の峰1丁目10-8 Hyogo (JP). 清水 一郎 (SHIMIZU, Ichiro) [JP/JP]; 〒546-0024 大阪府大阪市東住吉区公園南矢田1丁目16-1-1001 Osaka (JP). 佐藤 匡生 (SATO, Masao) [JP/JP]; 〒655-0872 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6丁目31-17 三青荘 Hyogo (JP). 西 聡子 (NISHI, Akiko) [JP/JP]; 〒674-0069 兵庫県明石市大久保町わかば7-5 D202

Hyogo (JP). 山下 憲司 (YAMASHITA, Kenji) [JP/JP]; 〒761-8003 香川県高松市神在川窪町332-3 Kagawa (JP). 金子 正 (KANEKO, Tadashi) [JP/JP]; 〒359-0012 埼玉県所沢市坂之下984-2 Saitama (JP). 大串 始 (OHGUSHI, Hajime) [JP/JP]; 〒634-0006 奈良県橿原市新賀町129-10-607 Nara (JP). 服部 耕治 (HATTORI, Koji) [JP/JP]; 〒634-0006 奈良県橿原市新賀町248-1-321 Nara (JP). 上松 耕太 (UEMATSU, Kota) [JP/JP]; 〒634-0051 奈良県橿原市白檀町8丁目11-10 Nara (JP).

(74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUPPORT FOR TISSUE REGENERATION AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 組織再生用支持体及びその製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a support on which cells can be uniformly distributed and stably held and fixed during culture and which ensures favorable proliferation and survival of the cells and, in the case of a cartilage, allows fixation procedures such as suture in the transplantation into an affected part after the completion of the culture, and has such a mechanical strength as withstanding (weight-loaded) compression at the early stage of the transplantation. A three-dimensional porous support for tissue regeneration having a structure wherein vertically long pores having a pore diameter of from 10 μ m to 500 μ m and a pore length of from 20 μ m to 1 cm are arranged in parallel by a construction technique mainly based on quick freeze-drying. The above-described three-dimensional porous support wherein the cell-sowing properties are improved by enlarging the pores in one face by peeling, surface salt-elution or a combination of these procedures. By sowing tissue-origin cells or precursor cells on this support and culturing them in artificial environment and/or *in vivo*, a three-dimensionally bonded cell mass showing an excellent ability to form a tissue and a favorable therapeutic effect can be obtained.

(続葉有)



(57) 要約:

本発明は、培養時に細胞を均一な分布状態で安定に保持・生着させ、さらに良好な増殖・生存性を確保でき、特に軟骨の場合には、加えて培養後、患部への移植時に縫合等の固定処理が可能であり、かつ移植初期の（加重）圧縮に耐える機械的強度を併せ持った支持体を提供する。

本発明は、急速な凍結乾燥をキー技術とする作製方法により、孔径 $10\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下、孔長 $20\mu\text{m}$ 以上 1cm 以下の縦長形状の孔が並列的に配置された構造を有する組織再生用の三次元多孔性支持体である。また、剥離操作、表層部の塩溶出処理操作、又はそれらの組み合わせによる片面の孔拡大処理により、細胞の播種性を高めた同三次元多孔性支持体である。この支持体に組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内及び／又は生体内で培養することにより、優れた組織形成度及び治療効果を有する三次元細胞結合体の作製が可能となる。

明細書

組織再生用支持体及びその製造方法

技術分野

- 5 本発明は、生体組織の再生に適した三次元多孔性支持体及びその製造法、さらに同支持体を用いた三次元細胞結合体及びその製造法に関するものである。

背景技術

- 10 現在、世界中で何千万人もの人々が事故による組織損傷や重傷の臓器不全の治療を受けているが、現行の臓器移植等、外科的治療や薬事治療は、臓器供給あるいは薬自体の効果の問題等で十分な治療ができているとはいえない状況である。そこでそのような患者に移植できる種々の生体組織の再生に関わる研究がさかんに行われている。特に軟骨については、スポーツ障害、変形性関節症等、国内だけで数百万人の患者がいるとされ、この疾患の治療を目指した培養軟骨の製造を
- 15 可能にする技術の開発が強く望まれている。なお、ここでいう培養軟骨とは、軟骨細胞で構成される三次元細胞結合体を指す。

- 培養軟骨の製造については、Minasら、Sittinger、Naughtonらの試験管、培養器内のような人工環境内での三次元担体構造体での作製例（Minasら、Articular Cartilage Defects, 20 1997年，20巻，第6号，525－538頁；国際公開第94／20151号パンフレット；国際公開第95／33821号パンフレット）、またVacantiらやNaughtonらの支持体／細胞混合物を用いたインビボ（in vivo）での軟骨形成の例（米国特許第5041138号明細書；国際公開第90／1203号パンフレット；国際公開第97／30662号パンフレット）
- 25 が報告されている。

培養軟骨の製造においては、まず細胞を播種し、培養する足場として十分な機能、そしてある程度の機械的強度を有する支持体の確保が重要である。すなわち、培養時に細胞を均一な分布状態で安定に保持・生着させ、さらに良好な増殖・生存性を確保できるものであり、加えて培養後、患部への移植時に縫合等の固定処

理が可能であり、かつ移植初期の（加重）圧縮に耐える機械的強度を併せ持った支持体を用いることが必要である。

- そのアプローチとして種々の生分解性のプラスチックの利用が検討されており、V a c a n t iらは、グリコール酸と乳酸の共重合体（P L G A）を塩溶出法で
- 5 多孔質化した支持体を用いた培養軟骨作製を報告している（米国特許第5 0 4 1 1 3 8号明細書）。また、先述のN a u g h t o nらは、生分解性プラスチックのひとつであるポリグリコール酸でフェルト化した支持体に軟骨細胞を播種し、培養することによる培養軟骨作製を報告している（国際公開第9 7 / 3 0 6 6 2号パンフレット）。しかしながら、これらの方法、特に塩溶出法による多孔性支持体では、強度的にはある程度の性能を確保できるが、細胞の生着性に問題があり、生体に近い均一に細胞が分布した組織形成を確保した軟骨作製ができていないというのが現状である。また、ポリグリコール酸でフェルト化した支持体も細胞の生着性に課題を残しており、均一な組織形成不十分という点では同様の状況である。
- 10 15 これらの解決方法のひとつとして、C h e nらにより、機械的強度を有する生分解性プラスチックP L G Aと細胞生着性を有するコラーゲンを組み合わせた支持体を用いた軟骨作製例の報告がなされているが（C h e nら, J. B i o m e d. M a t e r. R e s., 2 0 0 0年, 5 1巻, 2 7 3 - 2 7 9頁）、狂牛病等、コラーゲン自体の安全性が問われている最近の状況では、極力コラーゲンを
- 20 用いない支持体の開発が望まれているのが実状である。

- 上述したように、従来開発された生分解性プラスチックを利用した多孔性支持体に関しては、細胞の生着性に問題があり、生体に近い均一に細胞が分布した組織形成を確保した軟骨作製ができていないというのが現状である。また、このような問題を解決するためにコラーゲンを利用した支持体による軟骨作製例の報告
- 25 がなされているが、コラーゲンの安全性の観点より問題がある。

加えて軟骨欠損部は、軟骨下骨より炎症性の細胞の侵入、それによる繊維化軟骨の形成の問題が指摘されており、開発を目指す培養軟骨は、移植時に炎症性の細胞の浸潤を防ぐ性能を有することが望ましく、このためには、用いる三次元多孔性支持体については、軟骨下骨接触面は培地等の通性を阻害することなく、炎

症性の細胞の浸潤を阻む構造を有することが望ましい。

さらに、三次元多孔性支持体は、細胞播種の段階で効率的に細胞を導入させることが可能であり、かつ導入後は細胞が漏れにくいという特性を有することが望ましい。

5

発明の要約

以上の問題解決を目的として我々は研究を行い、3℃/分の温度低下を可能にするような急速な凍結乾燥をキー技術とする作製方法により、これらを解決する支持体の作製及びその作製技術の開発に成功した。

- 10 すなわち、第1の本発明は、孔径10 μm 以上500 μm 以下、孔長20 μm 以上1 cm以下の縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径10 μm 以下の小孔で連通した構造を有する組織再生用の三次元多孔性支持体に関する。

- 15 また、第2の本発明は、a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、b) 調製した溶液を型枠に流し込んだ後、3℃/分以上の冷却速度で凍結し、c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去する工程からなる上記三次元多孔性支持体の製造法に関する。

- さらに、第3の本発明は、上記三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内において培養することにより得られる
20 三次元細胞結合体に関する。

また、第4の本発明は、上記三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内及び／又は生体内で培養することからなる三次元細胞結合体の製造法に関する。

- 本発明の支持体は、細胞の保持、生育性に優れ、また、この支持体を用いて、
25 組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内で培養することにより、生体移植時に炎症性の細胞の浸潤を防ぎ、周辺組織との適合性のある生体本来の組織に近い性質を有する三次元細胞結合体を作製することが可能となる。

発明の詳細な開示

本発明の組織再生用の三次元多孔性支持体は、孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上 $500\ \mu\text{m}$ 以下、孔長 $20\ \mu\text{m}$ 以上 $1\ \text{cm}$ 以下の縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造を有することを特徴とする。

本発明の多孔性支持体は、例えば紡錘状等の縦長形状の孔が並列に並んだ構造を有する。上記孔の孔径は $10\ \mu\text{m}$ 以上 $500\ \mu\text{m}$ 以下であり、細胞を導入可能でかつ漏れにくい構造の確保の点から、好ましくは $20\ \mu\text{m}$ 以上 $150\ \mu\text{m}$ 以下である。上記孔の孔長は $20\ \mu\text{m}$ 以上 $1\ \text{cm}$ 以下であるが、支持体内の培地拡散性保持の点から、好ましくは $50\ \mu\text{m}$ 以上 $5\ \text{mm}$ 以下である。

本発明の支持体では、並置された各孔間は孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造となっている。「孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造」とは、上記縦長形状の孔の全個数の 50% 以上、好ましくは 70% 以上が、孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以下である小孔で互いに連結された構造を意味する。この小孔は、培地等の溶液は通すが、細胞は通さないものである。

本発明の支持体において、有孔率は 70% 以上であることが好ましいが、細胞密度確保の点から $70\sim95\%$ のものがより好ましい。ここで「有孔率」とは、支持体における縦長形状の孔と小孔との合計の割合をいい、単位体積あたりの支持体材料の重量から算出したものである。

また、孔径及び孔長は、電子顕微鏡観察による単位視野あたりに存在するすべての孔の内径、長さの測定を最低3視野について行い、このデータを統合することにより算出した。

本発明において「組織再生用」とは、生体を構成する種々組織の再生用を意味する。

本発明の多孔性支持体の構造としては、不織布、フォーム、スポンジ、織物構造等が挙げられるが、機械的強度を考慮してフォーム又はスポンジ構造のものが好ましい。

本発明の多孔性支持体の形状については、三次元のものであれば特に限定されず、例えば、平板状のもの、球状等の球面構造を有するもの等が使用可能であるが、支持体内の培地拡散を十分かつ均等に確保する等の点から平板状が好ましい。また、支持体を平板状にまず作製した後、これを厚みを有する円筒状（チューブ

状)等の形状に変形させたものを用いることもできる。

本発明の多孔性支持体について、以下に平板形状を例に説明する。

この支持体は、両方の面に10 μ m程度の孔が開いている形状のもので、培地
5 通性は十分確保した上で細胞が通過しにくい構造を有している。これは、支持体
の中に導入された細胞が漏れ出ること防ぐとともに、外部、特に軟骨下骨から
の炎症性細胞の浸潤を防ぐために有効な構造である。また、各孔間の横方向の連
通性については、培地の移動は可能であるが、細胞の移動はできない孔径10 μ
m以下のサイズの孔で連通しており、細胞の生育性に良好な環境を与え、播種さ
れた細胞が横面から漏出することを防ぐ構造を有している。

- 10 本発明のより好ましい態様として、厚み方向に縦長な形状の孔が面方向に並列
的に配置された概平板形状を有し、一方の面が開孔処理されている三次元多孔性
支持体を挙げることができる。

- ここで、「厚み方向」とは縦長孔の縦長方向を意味し、「縦長な形状の孔が面
方向に並列的に配置」とは縦長孔を同じ方向に並置することを意味する。また、
15 「概平板形状」とは完全な平板形状はもちろんのこと、平板形状に近い形状であ
るものを全て含むものである。

「開孔処理」とは孔径を拡大させることを意味し、例えば以下のような塩溶出
法による開孔処理、剥離法による開孔処理等が挙げられる。

- 20 塩溶出法とは、支持体を作製する時に、片面の表層部についてのみ、リーチン
グ法と呼ばれる塩溶出処理操作を組み合わせた方法である。これにより、片面を
孔拡大することができ、さらにロート状の形状をとることにより、孔への細胞導
入を効率的に行うことができる。

- 剥離法とは、後述の本発明の凍結乾燥法で作製した支持体が、例えば紡錘状の
縦長形状の孔の厚み方向の中央付近に広面と並行に空隙あるいは結晶境界を形成
25 することを活用し、支持体を中心部あたりで縦に割く形で、つまり平板方向に剥
離して作製する方法である。これにより、一方の面(剥離面)に、細胞が容易に
通過できる孔径50～150 μ m平均の孔を確保できる。

本発明の多孔性支持体の材質は特に限定されないが、生理学的条件下で体内に
吸収される物質、つまり生体適合性材料が好ましく、これは天然のものでも合成

物質でもよい。

多孔性支持体を構成する生体適合性材料としては、天然物から得られるものと合成により得られるものが挙げられるが、加工性、滅菌性、感染性の点から、加水分解により分解し得る合成ポリマーが好ましく、特に α 及び β -ヒドロキシカルボン酸の加水分解性ポリマーが好ましい。このような生体適合性材料の例として、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸／グリコール酸共重合体、ポリ ϵ -カプロラクトン、乳酸／ ϵ -カプロラクトン共重合体等が挙げられる。

本発明で使用するグリコール酸と乳酸との共重合体（PLGA）等の共重合体としては、グリコール酸と乳酸との重量比が、99：1～1：99である共重合体、特に75：25～25：75である共重合体が好ましい。また、他の共重合体についても、乳酸以外のモノマーと乳酸との重量比は、上述したグリコール酸と乳酸との重量比と同じ範囲にあることが好ましい。

本発明の支持体は、厚さを適宜設定し、患部を補填するために必要なサイズにすることができる。本発明の支持体の厚さは、好ましくは50 μ m～1cmである。なお、ヒトの膝あるいは股関節の治療に用いる場合には、1～3mmの厚さのものが実際上好ましい。

また、上記支持体の形状及び面積については特に限定はなく、患部を補填するために十分なサイズのものを作製することができる。例えば、ヒトの膝あるいは股関節の治療に用いる場合には、好ましくは10～20mmの直径の円筒形のもの

が挙げられる。

次に三次元多孔性支持体の製造法について説明する。

本発明の三次元多孔性支持体の製造法は、下記の工程からなることを特徴とする：

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を型枠に流し込んだ後、3℃/分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去する。

なお、当該製造法を本発明の凍結乾燥法ともいい、特に両面から同時に3℃/分以上の冷却速度で急速に凍結することを特徴とする。

凍結乾燥処理に先立ってこれら支持体材料を溶液状にするにあたり、溶媒とし

ては、通常種々の有機溶媒を用いることができるが、好ましくはクロロホルム、ジオキサン、ポリエチレングリコール等である。

また、溶解させた支持体材料の溶液を流し込む型枠について、その材質は特に限定されるものではないが、凍結乾燥処理に耐える材質である金属、ガラス製等
5 が好ましい。

また、上記型枠の形状は特に限定されず、例えば軟骨損傷治療の場合には、軟骨の構造に類似する概平板形状を用いる等、再生を目指す各組織の形状の構築を基本とするものであれば、各疾患の治療上有効な形状については、すべて使用することができる。

- 10 凍結による固化は、少なくとも $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の温度低下、つまり $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度となるように急速に凍結させることが必要となる。当該冷却速度は、好ましくは $5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上、 $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下である。また、特に両面から急速に凍結させることが好ましい。

- 15 当該冷却速度は、支持体材料を有機溶媒に溶解して得た溶液を型枠に流し込んだものを -40°C のフリーザーに入れ、当該溶液が固化するまでの時間から算出したものである。

- 上記冷却速度（温度低下）は、例えば、超低温フリーザーや液体窒素を用いることにより可能となるが、特に、支持体材料含有溶液の両面（当該溶液を型枠に流し込み、その上面にガラス板等で蓋をする）に、 -40°C に冷えたブロック（
20 物体）を接触させることにより、急速冷凍することが好ましい。

この後、凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去することにより、三次元多孔性支持体を得ることができる。

- 本発明の好ましい態様である、厚み方向に縦長な形状の孔が面方向に並列的に配置された概平板形状を有し、一方の面が開孔処理されている三次元多孔性支持体は、剥離法を用いた下記の工程から製造することができる：
25

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を、概平板形状になるような型枠に流し込んだ後、 $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、

d) 乾燥後の支持体を厚み方向の中心部で平板方向に剥離する。

なお、本明細書において、「厚み方向の中心部で平板方向に剥離する」とは、支持体の厚み方向の中央付近で、平板の上下方向に剥離することを意味する。

上記概平板形状を有し、一方の面が開孔処理されている三次元多孔性支持体は、

5 塩溶出法を用いた下記の工程から製造することもできる：

a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、

b) 概平板形状になるような型枠に粒状塩を分散させ、

c) 調製した溶液を上記型枠に流し込んだ後、 $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度で凍結し、

d) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、

10 e) 粒状塩を水洗により除去する。

ここで、粒状塩とは、粒子径 $5000\mu\text{m}$ 以下の結晶性物質を意味し、 KCl 、 NaCl 、 CaCl_2 のような無機塩、各種アンモニウム塩、クエン酸三ナトリウムのような有機化合物の塩等が挙げられる。粒子径の点から、クエン酸三ナトリウムが特に好ましい。

15 粒状塩の粒子径としては、好ましくは $50\sim 2000\mu\text{m}$ 、より好ましくは $200\sim 800\mu\text{m}$ である。

塩溶出法を用いた本発明の方法で三次元多孔性支持体を作製した場合、支持体の厚みの $1\sim 50\%$ で塩溶出処理部による孔が形成され、残りの $50\%\sim 99\%$ で上記縦長形状の孔が形成された構造となる。

20 本発明の三次元細胞結合体は、本発明の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内において培養することにより得られる。

つまり、本発明でいうところの三次元細胞結合体とは、組織由来の細胞又は前駆細胞を本発明の支持体に播種して、これを人工環境内及び／又は生体内で培養
25 することで作製された生体の各器官、組織の類似体をいう。

本発明で用いる組織由来の細胞又は前駆細胞としては、例えば、骨、軟骨、靱帯、腱、血管、皮膚、脂肪、筋肉、神経、心臓、肝臓、脾臓、腸、腎臓、角膜、膀胱、尿管、尿道、乳房等、生体の各器官又は組織由来の、細胞又は前駆細胞；骨髄、臍帯血由来の間葉系幹細胞等の幹細胞等を用いることができる。

このうち、組織構造の単純性の観点から、骨、関節軟骨、靱帯、腱由来のものが、また、採取の容易さと、種々の分化への高い分化能を有するという観点から、骨髄、脂肪、肝臓、臍帯血由来のものが好ましく用いられ、間葉系幹細胞であるものがより好ましく用いられる。

- 5 また、組織再生のために用いることから、当該三次元細胞結合体は、上記生体本来の各器官や組織に近い性質を有することが好ましい。「組織に近い性質」とは、組織染色で算出した細胞数より求めた組織形成度が生体の70%以上となることを意味する。

- 10 なお、組織染色に用いられる色素としては、例えば、アルシアンブルー、ヘマトキシリン、ヘマトキシリン・エオシン、アリザリンレッド、サフラニンオー、トルイジンブルー等が挙げられる。

本明細書中において、「人工環境内で培養」とは、試験管内、培養器内等、生体外で培養することを意味する。

- 15 また、「生体内で培養」とは、例えば、支持体を生体組織内に設置して細胞を培養するような、生体組織内での培養を意味する。

本発明の三次元細胞結合体としては、塩溶出法を用いる本発明の方法で作製した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内において培養することにより得られ、生体軟骨の1/10以上の圧縮弾性率を有する三次元細胞結合体も挙げられる。

- 20 本発明における力学強度測定条件では、当該三次元細胞結合体の圧縮弾性率は、生体軟骨並から生体軟骨のほぼ1/10以上の強度の範囲、より具体的には $1.5 \times 10^{-1} \text{MPa} \sim 2.0 \text{MPa}$ である。生体軟骨並あるいはそれよりも低い強度である点は、当該三次元細胞結合体を実際に患部に埋め込んだ際、反対側の軟骨組織を痛めることを回避する点で極めて有効な性質であるといえる。なお、
25 当該圧縮弾性率は、三次元細胞結合体において開孔処理された部分を除く部分（内部構造）で求めたものである。

ここで、本発明における力学強度測定条件とは、作製した三次元細胞結合体を、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）溶液中25℃にて30分間平衡化後、ヘッドスピード0.1mm/秒で圧縮を加えるものである。

また、圧縮弾性率とは、圧縮時に受ける応力の歪みに対する変化率である。圧縮弾性率は、ASTM: D1621-94に準拠した「テクスチャーアナライザーTA-XT2i (Stable Micro Systems社製)」付属の制御解析ソフトにより測定することができる。

- 5 本発明の別の三次元細胞結合体としては、塩溶出法を用いる本発明の方法で製造した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体であって、開孔処理側あるいは非開孔処理側からの厚みが全体の厚みの1%から90%の範囲で生体軟骨により近い組織構造を有する三次元細胞結合体も挙げられる。

- 10 ここで「全体の厚み」とは、開孔処理をしていない面側より開孔処理をした面側までの幅方向の長さのことを意味する。また、「生体軟骨により近い組織構造」とは、組織染色で算出した細胞数より求められた組織形成度が生体軟骨の70%以上となり、かつ、生体軟骨の1/10以上の機械的強度を有する構造を意味する。

- 15 次に、本発明の三次元細胞結合体の製造法について説明する。

上記製造法は、本発明の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内及び／又は生体内で培養することを特徴とする。

- 上記製造法において、組織由来の細胞あるいは前駆細胞の播種は、公知の方法で行うことができるが、支持体1cm³あたり10⁶～10⁸個の密度となるように細胞又は前駆細胞を播種することが好ましい。

上記方法において、組織由来の細胞あるいは前駆細胞は、あらかじめ三次元環境下で1時間から48時間静置培養されたものであることが、細胞の支持体への固定の観点から好ましい。

- 25 ここで「三次元環境下で培養する」とは、細胞の固まりを形成させた状態で培養を行うことを意味する。上記培養をマイクロマス培養というが、本培養の具体的な方法としては、例えば、96穴の平板プレートに10⁵～10⁷個/穴の細胞を入れて培養する方法等が挙げられる。

本発明の支持体に組織由来の細胞又は前駆細胞を播種して培養するにあたり、細胞の創製を促進するために種々の添加因子を共存させることができる。添加因

子としては、例えば、bFGF（塩基性繊維芽細胞増殖因子）、BMP（骨形成因子）、TGF- β （変換増殖因子 β ）、IGF（インスリン様増殖因子）、PDGF（血小板由来増殖因子）等の高分子蛋白性因子；ヒアルロン酸、コンドロイチン等のムコ多糖；アスコルビン酸、トコフェロール、コエンザイムQ10等の各種ビタミン類等が挙げられる。

なお、アスコルビン酸の存在下での培養が細胞増殖及び組織創製に極めて有効であることから、上記添加因子としてはアスコルビン酸が特に好ましい。

上記添加因子の添加量は、添加因子の種類によって異なるが、培地中での終濃度が0.001~1000 μ g/mlとなるよう添加することが好ましい。

また、本発明の三次元細胞結合体の製造法において、人工環境内の培養は、培養液を支持体に対し毎秒0.1cmから毎秒5.0cmの速度で移動させる条件で行われることが、三次元細胞結合体への新鮮な培地の供給の観点、また三次元細胞結合体からの老廃物の除去の観点より好ましい。

さらに、後述の本発明の実施例における軟骨創製では、関節より採取した細胞を平板培養で増幅し、マイクロマス培養を行った後に支持体への播種を行っている。これは平板培養で低下した軟骨機能を回復させる目的で実施されたもので、実際、軟骨細胞の機能マーカーであるプロテオグリカン、II型コラーゲンのmRNA発現及び同蛋白質生産の回復を確認している。

以上の方法で作製された三次元細胞結合体は、例えば、後述の本発明の実施例で作製した軟骨組織を例に挙げると、アルシアンブルー色素を用いた組織染色評価の結果、非開孔処理面側にアルシアンブルーに強く染まる部分が偏在しており、この面側に正常様の軟骨形成が進んでおり、逆に開孔処理面側にアルシアンブルー染色性の弱い部分が偏在しており、この面側では組織形成が進んでいない箇所が遍在することが示された。このような組織形成の偏りは、本培養軟骨組織を用いた治療において、移植片の周囲部組織（骨、軟骨）との整合性を確保する上で有利な構造であると考えられる。

また、上記本発明の三次元多孔性支持体又は三次元細胞結合体を生体内に移植することにより、特に軟骨損傷を効果的に治療することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の支持体の厚さ方向から見た断面、開孔処理を行った側から見た面、開孔処理を行っていない側から見た面の電子顕微鏡写真図である。

図2Aは、本発明の凍結乾燥方法で作製した支持体の、厚さ方向から見た断面の電子顕微鏡写真図である。

図2Bは、従来の凍結乾燥方法で作製した支持体の、厚さ方向から見た断面の電子顕微鏡写真図である。

図3は、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）を示した図である。

図4は、培養軟骨プロテオグリカン（アグレカン）のELISA定量の結果を示した図である。

図5は、培養軟骨II型コラーゲンのELISA定量の結果を示した図である。

図6は、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）の結果を示した図である。

図7は、本発明の支持体Aと従来の塩溶出法で作製した支持体Bにおける、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色及びアルシアンブルー（AB）染色による培養軟骨組織染色性を比較した結果を示した培養軟骨組織染色図である。

図8Aは、アスコルビン酸を含まない培地で培養した場合の、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）の結果を示した図である。

図8Bは、アスコルビン酸（ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含む培地で培養した場合の、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）の結果を示した図である。

図9Aは、マイクロマス培養を行った場合の、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）の結果を示した図である。

図9Bは、マイクロマス培養を行わなかった場合の、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）の結果を示した図である。

図10は、実施例7に示した培養軟骨の力学強度測定の結果を表すグラフである。

図11は、培養軟骨組織のアルシアンブルー染色陽性部を拡大して示した図である。

図12は、培養軟骨プロテオグリカン（アグレカン）のELISA定量の結果を示した図である。

図 1 3 は、培養軟骨組織のアルシアンブルー染色像を広範囲に示した図である。

図 1 4 は、実施例 9 に示した培養軟骨の力学強度測定の結果を表すグラフである。

5 図 1 5 は、実施例 1 0 に示した培養骨のアリザリンレッド染色の結果を示した図である。

図 1 6 A は、実施例 1 1 に示した間葉系幹細胞を播種した P L G A 支持体を用いたウサギでの自家軟骨欠損治療の 4 週経過の患部外観写真及び患部組織染色（ヘマトキシリン・エオシン（H E）、アルシアンブルー（A B）染色）の結果を示した図である。

10 図 1 6 B は、実施例 1 1 に示した間葉系幹細胞を播種した P L G A 支持体を用いたウサギでの自家軟骨欠損治療の 1 2 週経過の患部外観写真及び患部組織染色（ヘマトキシリン・エオシン（H E）、アルシアンブルー（A B）染色）の結果を示した図である。

15 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

（実施例 1）P L G A 支持体の作製方法

20 a. 塩溶出法による開孔処理をした P L G A 支持体の作製方法

生体適合性材料である乳酸／グリコール酸共重合体（重量比＝7 5：2 5）をジオキサンに溶解し、当該共重合体の濃度を 4 重量％に調整した。ガラス板で作製した型枠に、粒状塩として、2 1 2 μ m 径及び 8 5 0 μ m 径の篩を用い、約 2 1 2 μ m 径以下及び約 8 5 0 μ m 径以上のサイズのものを除去したクエン酸三ナトリウムを約 0. 0 5 g / c m² になるよう分散させ、調整した上記溶液を 2 m m の厚さになるまで流し込み、ガラス板で蓋をした。次に、これを－4 0℃のフリーザーに入れ、－4 0℃に冷えたブロック（物体）を両面からこれに接触させ、両面から急速に凍結して（5℃／分の冷却速度）、凍結後、－0. 1 M P a で 4 8 時間真空乾燥し、ジオキサンを除去した。乾燥後、型枠から剥離し、流水にて

粒状塩を洗い流し、十分に乾燥させることにより、支持体を得た。

得られた支持体の厚さ方向から見た断面、塩溶出処理した側（すなわち、開孔処理を行った側から見た面）、開孔処理を行っていない側から見た面の電子顕微鏡写真を図 1 に示す。開孔処理した側の孔は、開孔処理していない側の孔の大きさに比べて大きくなっていることが確認された。また、塩溶出法で作製した支持体の塩溶出処理部の厚みは全体の 15% であった。

b. 剥離法による開孔処理をした PLGA 支持体の作製方法

生体適合性材料である乳酸／グリコール酸共重合体（重量比＝75：25）をジオキサンに溶解し、当該共重合体の濃度を 4 重量％に調整した。ガラス板で作製した型枠に、調整した上記溶液を 2 mm の厚さになるまで流し込み、ガラス板で蓋をした。次に、これを -40℃ のフリーザーに入れ、-40℃ に冷えたブロック（物体）を両面からこれに接触させ、両面から急速に凍結して（5℃／分の冷却速度）、凍結後、-0.1 MPa で 48 時間真空乾燥し、ジオキサンを除去した。乾燥後、型枠から剥離し、十分に乾燥させた後に、厚み方向の中心部で平板方向に剥離することにより支持体を得た。

（比較例 1）従来の凍結乾燥法で作製された支持体の構造

本発明の比較対照として、通常（従来）の凍結乾燥法により PLGA 支持体の作製を行った。すなわち、乳酸／グリコール酸共重合体（重量比＝75：25）をジオキサンに溶解し、当該共重合体の濃度を 4 重量％に調整した溶液を、ガラス製の型枠に 2 mm の厚さになるまで流し込んで、片面からのみ凍結後、真空乾燥し、ジオキサンを除去して乾燥する方法により、PLGA 支持体の作製を行った。

図 2 A に、本発明の方法（実施例 1-a）により作製した支持体断面の電子顕微鏡解析像を、図 2 B に、従来の凍結乾燥法（比較例 1）で作製した支持体断面の電子顕微鏡解析像を示した。本発明の方法で作製した支持体は、縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径 10 μ m 以下の小孔で連通した構造を有していた。これに対して、従来の方法で作製した支持体では、孔の連続性、

方向性に乏しく、また、本発明による開孔処理に相当する十分に大きな孔は認められず、厚みのムラが大きく、明らかに孔形状、構造が異なっていることが確認された。

また、実施例 1 - b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1 - a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

(実施例 2) PLGA 支持体を用いた培養軟骨の作製

生後約 1 年の日本ザーネン種ヤギ膝関節より軟骨組織を採取し、コラゲナーゼにより軟骨細胞を分離した。この細胞を 10% ウシ胎児血清及び終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸を含有する Ham's F-12 培地を用いて培養し、2 回継代した軟骨細胞を 96 穴組織培養プレートへ 1 穴当たり 1×10^6 個加えて一晩 (約 16 時間) マイクロマス培養を行った後、培養軟骨の作製に供した。

25 キログレイ (KGr y) で γ 線滅菌した実施例 1 - a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体を前記培地中に置き、減圧下で脱気して支持体表面に培地をなじませた後、マイクロマス培養を行った軟骨細胞を支持体 1 cm^3 当たり 1×10^7 個の密度となるように播種した。軟骨細胞を播種した支持体を培養シャーレに置き、同培地を支持体が隠れる程度に加え、1 晩静置培養した。この後、20 ml の同培地がはいった直径 10 cm の培養シャーレに支持体を移し、水平円運動を行える振盪機を用いて 30 rpm の回転数で旋回培養を行った。旋回培養開始後 14 日目に支持体を取り出し、作製された培養軟骨を組織学的及び生化学的 (ELISA: Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) に評価した。

この PLGA 支持体を用いて作製された培養軟骨の組織像は、図 3 に示されたように顕著なアルシアンブルー陽性を呈した。さらに、これらの組織中に存在する軟骨細胞は繊維芽細胞様の形態ではなく、永久軟骨細胞と非常に似かよった形態を有していた (図 3)。この培養軟骨を 4M グアニジン塩酸溶液で可溶化し、ELISA により軟骨に特徴的なプロテオグリカンであるアグレカン及び軟骨に特徴的なコラーゲンである II 型コラーゲンの検出を試みたところ、アグレカン

及びⅡ型コラーゲンの存在が認められた（図4、図5）。また、このPLGA支持体は、片側が孔拡大され、もう一方の側が細胞の通過を妨げる細孔構造を有しているという構造上の特徴を持つ。作製された培養軟骨は、非開孔（非孔拡大）処理側ではアルシアンブルー強陽性を示し、細胞の形態も永久軟骨に極めて近く、開孔（孔拡大）処理側ではアルシアンブルーの染色性はやや弱いまま残っているという組織形成の極性が見られた（図6）。

また、実施例1-bの剥離法で作製したPLGA支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例1-aの塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

（実施例3）本発明方法で作製したPLGA支持体の細胞保持能比較

実施例1-aの塩溶出法で作製したPLGA支持体（支持体Aとする）に軟骨細胞を播種してその細胞保持能を検討した。軟骨細胞の調製及び支持体への播種は実施例2に記載された方法により行った。支持体Aを直径10mm、厚さ1mmのディスク状（容積78.5mm³）に整形し、これらに5×10⁷個/mlの細胞濃度に調製した軟骨細胞懸濁液30μlを各支持体に播種した。これを培養シャーレ上で1時間静置した後、支持体から漏出した培地中の細胞数を計測した（表1）。

表1に示すように、支持体Aでは、培地中に検出された漏出した細胞の数は、播種した細胞数の0.033%であった。これは、下記比較例2で示した従来法（塩溶出法）で作製したPLGA支持体（支持体B）の細胞保持能と比べて、極めて高いものであった。

また、実施例1-bの剥離法で作製したPLGA支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例1-aの塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

（比較例2）従来法の塩溶出法で作製したPLGA支持体の細胞保持能

従来法の塩溶出法で作製したPLGA支持体（支持体Bとする）に軟骨細胞を播種して、その細胞保持能を検討した。この方法によるPLGA支持体は、Mi

k o sらの方法 (B i o m a t e r i a l, 1993年, 14巻, 323-330頁) に従い作製され、支持体全体に塩粒子に起因する孔が形成されたものであった。軟骨細胞の調製、支持体への播種及び漏出した細胞の計測は、実施例2及び3に記載された方法により行い、結果を表1に示した。

- 5 この結果から、従来法の塩溶出法で作製した支持体では、播種した細胞懸濁液中の細胞がかなり漏出していることが分かる。

表1 細胞保持能の比較

	支持体A	支持体B
播種した細胞懸濁液の容量	30 μ l	30 μ l
播種した細胞数 (a)	1.5 $\times 10^6$ 個	1.5 $\times 10^6$ 個
漏出した培地の量	10 μ l	10 μ l
漏出した培地中の細胞数 (b)	~500 個	~2.5 $\times 10^5$ 個
漏出細胞率 (b/a $\times 100$)	0.033 %	16.7 %

(比較例3) 従来法の凍結乾燥法で作製したPLGA支持体の細胞保持能

- 10 比較例2と同様の方法で、従来の凍結乾燥法(比較例1)で作製した支持体の細胞保持能を調べた。

その結果、実施例3で示したように本発明による支持体が播種した細胞の99%を保持したのに対し、従来の凍結乾燥法で作製した支持体では、逆に1%以下が支持体に保持されるに留まった。

15

(実施例4) 本発明方法で作製したPLGA支持体を用いて作製した培養軟骨の組織形成度(組織染色)

- 実施例1-aの塩溶出法で作製したPLGA支持体(支持体A)に軟骨細胞を播種して、その組織形成度を比較した。軟骨細胞の調製、支持体への播種及び播種した細胞の培養は実施例2に記載された方法により行った。支持体Aを旋回培養開始後30日目に取り出し、組織学的評価に供した。再生軟骨組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色像及びアルシアンブルー染色像を図7に示した。
- 20

図7からわかるように、本発明のPLGA支持体を用いて作製した培養軟骨は、

生体軟骨とほぼ同等の細胞密度を有し、アルシアンブルー染色性も陽性を呈した。

また、実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

5

(比較例 4) 従来法 (塩溶出法) で作製した PLGA 支持体を用いて作製した培養軟骨の組織形成度 (組織染色)

比較例 2 の支持体 B を用いた以外は、実施例 4 と同様に行った。結果を図 7 に示した。

- 10 図 7 からわかるように、従来法 (塩溶出法) による PLGA 支持体を用いて作製した培養軟骨の組織形成度は、本発明方法による PLGA 支持体を用いて作製した培養軟骨の組織形成度に比べて極めて乏しいものであった。

(実施例 5) アスコルビン酸が培養軟骨の生成に及ぼす効果

- 15 以下のような方法で、アスコルビン酸が培養軟骨の生成に及ぼす効果について検討した。実施例 2 に記載された方法により、軟骨細胞を調製し、これを実施例 1-a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体に播種した。この支持体を、終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸を含む Ham' s F-12 培地と、アスコルビン酸を含まない培地で 2 週間培養し、軟骨組織の形成度をアルシアンブルーの
- 20 染色性により検討した。

図 8 A、図 8 B からわかるように、アスコルビン酸を培地に添加することにより軟骨組織の形成が顕著に改善された。

また、実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認され

25 た。

(実施例 6) マイクロマス培養が培養軟骨の生成に及ぼす効果

以下のような方法でマイクロマス培養が培養軟骨の生成に及ぼす効果について検討した。実施例 2 に記載された方法により、軟骨細胞を調製し、96 穴培養ブ

レートの1穴当り 1×10^6 個の細胞を加え、 CO_2 インキュベーター内に16時間静置し、マイクロマス培養を行った。この細胞を、実施例2に記載された方法により、実施例1で作製した支持体に播種し、2週間旋回培養を行った。このようにマイクロマス培養を行って作製した培養軟骨と、マイクロマス培養を行わないで作製した組織とのアルシアンブルー染色性を比較した(図9A、図9B)。

図9A、図9Bからわかるように、マイクロマス培養を行って作製した培養軟骨のアルシアンブルー染色性は、マイクロマス培養を行わないものに比べて良好であった。

10 (実施例7) 培養軟骨の力学強度測定

実施例1-aの塩溶出法で作製したPLGA支持体を用い、実施例2に記載された方法で作製し、さらに直径6.5mm、厚み1.5mmに整形した培養軟骨モジュールを、PBS溶液中25℃にて30分間平衡化後、ヘッドスピード0.1mm/秒で圧縮を加えた時に受ける応力を以下の方法で測定した。

15 すなわち、応力値 $2.5 \times 10^{-4} \text{MPa}$ を呈する歪みを ϵ_0 (サンプル表面)、応力値 $1.5 \times 10^{-2} \text{MPa}$ を呈する歪みを ϵ_{15} とし、その間を開孔処理された部分と認識した。また、圧縮弾性率は、開孔処理された部分を除く部分(内部構造)で求めることとし、歪みが ϵ_{15} から0.10増加する間の圧縮応力の変化率にて算出した(図10)。

20 なお、圧縮は、ASTM:D1621-94に準拠した上記の「テクスチャーアナライザーTA-XT2i (Stable Micro Systems社製)」付属の制御解析ソフトTexture Expert Exceedのマニュアルに従い、行った。図10中、「支持体」とは実施例1-aのPLGA支持体のみをPBSで平衡化したもの、「培養軟骨」とは本発明の三次元細胞結合体、
25 「生体軟骨」とはヤギ大腿骨軟骨であり、各サンプルの平均値及び標準偏差をプロットしている。また、「2W、3W、4W」とは、それぞれ旋回培養開始後2週間目、3週間目、4週間目の培養軟骨を意味する。

また、実施例1-bの剥離法で作製したPLGA支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例1-aの塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認され

た。

(実施例 8) PLGA 支持体を用いた培養軟骨の作製

ヒト間葉系幹細胞 (Biowhitaker 社製) 7.5×10^5 個を、1
5 0% ウシ胎児血清を添加した GIBCO 社製 DMEM 培地を用いて培養し、一週
間後、約 10 倍の細胞数に増幅した細胞を、以下のようにして培養軟骨の作製に
供した。

25 キログレイ (KGr y) で γ 線滅菌した実施例 1-a の塩溶出法で作製し
た PLGA 支持体を前記培地中に置き、減圧下で脱気して支持体表面に培地をな
10 じませた後、培養した上記間葉系幹細胞 (Biowhitaker 社製) を
支持体 1 cm^3 当り 1×10^7 個の密度となるように播種した。間葉系幹細胞を
播種した支持体を培養シャーレに置き、同培地を支持体が隠れる程度に加え、1
晩静置培養した。この後、20 ml の GIBCO 社製 DMEM 培地 (10 ng/ml TGF- β 3、 $50 \mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸 2-リン酸、 $100 \mu\text{g/ml}$ ビルビン酸ナトリウム、 $40 \mu\text{g/ml}$ プロリン、ITS-plus (Co
15 llaborative Biomedical Products)) がはい
った直径 10 cm の培養シャーレに支持体を移し、水平円運動を行える振盪機を
用いて 30 rpm の回転数で旋回培養を行った。旋回培養開始後 14 日目に支持
体を取り出し、作製された培養軟骨を組織学的及び生化学的 (ELISA) に評
20 価した。

この PLGA 支持体を用いて作製された培養軟骨の組織像は、図 11 に示され
たように顕著なアルシアンブルー陽性を呈した。さらに、これらの組織中に存在
する軟骨細胞は繊維芽細胞様の形態ではなく、永久軟骨細胞と非常に似かよった
形態を有していた (図 11)。この培養軟骨を 4M グアニジン塩酸溶液で可溶化
25 し、ELISA により軟骨に特徴的なプロテオグリカンであるアグレカンの検出
を試みたところ、アグレカンの存在が認められた。比較として、上記培地組成よ
り TGF- β 3 を除いて培養したサンプルを作製した (図 12)。また、この P
LGA 支持体は、片側が孔拡大され、もう一方の側が細胞の通過を妨げる細孔構
造を有しているという構造上の特徴を持つ。作製された培養軟骨は、非開孔 (非

孔拡大) 処理側ではアルシアンブルー強陽性を示し、細胞の形態も永久軟骨に極めて近く、開孔 (孔拡大) 処理側ではアルシアンブルーの染色性はやや弱いまま残っているという組織形成の極性が見られた (図 13)。

また、実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

(実施例 9) 培養軟骨の力学強度測定

実施例 1-a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体を用い、実施例 8 に記載された方法で作製し、さらに直径 6.5 mm、厚み 1.5 mm に整形した培養軟骨モジュールを、PBS 溶液中 25℃ にて 30 分間平衡化後、ヘッドスピード 0.1 mm/秒で圧縮を加えた時に受ける応力を以下の方法で測定した。

すなわち、応力値 2.5×10^{-4} MPa を呈する歪みを ϵ_0 (サンプル表面)、応力値 1.5×10^{-2} MPa を呈する歪みを ϵ_{15} とし、その間を開孔処理された部分と認識した。また、圧縮弾性率は、開孔処理された部分を除く部分 (内部構造) で求めることとし、歪みが ϵ_{15} から 0.10 増加する間の圧縮応力の変化率にて算出した (図 14)。

なお、圧縮は、ASTM: D1621-94 に準拠した上記の「テクスチャーアナライザー TA-XT2i (Stable Micro Systems 社製)」付属の制御解析ソフト Texture Expert Exceed のマニュアルに従い、行った。図 14 中、「支持体」とは実施例 1-a の PLGA 支持体のみを PBS で平衡化したもの、「培養軟骨」とは本発明の三次元細胞結合体、「生体軟骨」とはヤギ大腿骨軟骨である。また、「2W」とは、旋回培養開始後 2 週間目の培養軟骨を意味する。

また、実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

(実施例 10) PLGA 支持体を用いた培養骨の作製

25キログレイ (KGr y) で γ 線滅菌した実施例1-aの塩溶出法で作製したPLGA支持体を、10%ウシ胎児血清を含有するGIBCO社製 α MEM培地に置き、減圧下で脱気して支持体表面に培地をなじませた後、骨芽細胞株であるMC3T3細胞を、支持体1cm³当たり 1×10^7 個の密度となるように播種した。同細胞を播種した支持体を培養シャーレに置き、同培地を支持体が覆われる程度に加え、1晩静置培養した。この後、20mlの同培地が入った直径10cmの培養シャーレに支持体を移し、水平円運動を行える振盪機を用いて30rpmの回転数で巡回培養を行った。巡回培養開始後14日目に支持体を取り出し、作製された培養骨をアリザリンレッド染色により評価した。

このPLGA支持体を用いて作製された培養骨は、図15に示されたようにアリザリンレッド陽性を呈し、骨様組織が形成されていることが示された (図15中の「MC3T3」)。一方、生体軟骨細胞をPLGA支持体に播種して同様に培養したもの (図15中の「生体軟骨細胞」)、及び細胞を播種していないPLGA支持体 (図15中の「PLGA支持体」) では、アリザリンレッドに反応しなかった。

(実施例11) 間葉系幹細胞を播種したPLGA支持体を用いたウサギでの自家軟骨欠損治療

日本白色兎 (体重3~3.5Kg、3~4ヶ月齢) の上腕骨骨頭から骨髓穿刺針にて骨髓細胞を採取し、初期培養を2~3週間行った。培養された細胞を培地 (α MEM培地 (GIBCO社製)) に懸濁し、 5×10^7 個/mlに調製した。この細胞浮遊液をPLGA移植支持体の開孔面に滴下した。より具体的には、25キログレイ (KGr y) で γ 線滅菌した実施例1-aの塩溶出法で作製したPLGA支持体を前記培地中に置き、減圧下で脱気して支持体表面に培地をなじませた後、培養した間葉系幹細胞を支持体1cm³当り 1×10^7 個の密度となるように播種した。間葉系幹細胞を播種した支持体を培養シャーレに置き、同培地を支持体が隠れる程度に加え、1晩静置培養した。

次に、兎の大腿骨膝蓋関節面に直径約5mmの軟骨全層欠損を作成し、上記の細胞を播種したPLGA支持体を移植した (播種群)。同時に欠損のみの群 (欠

損群)とPLGA支持体のみを移植した群(支持体群)を作製し、対照とした。術後4、12週間後に屠殺し、肉眼的、組織学的に検討をした(図16A及びBの外観、ヘマトキシリン・エオシン(HE)、アルシアンブルー(AB)染色図参照)。

- 5 その結果、欠損群は、術後4週、12週後ともに肉芽組織で被われていた。支持体群に関しては、組織学的には4週後で担体の構造が残存するが、軟骨細胞が散在する線維組織で修復されており、アルシアンブルー染色で淡く染色された。移植12週後では欠損群と同様の結果であった。播種群に関しては、4週後では軟骨様組織で被われているが、周囲との境界が認められた。移植12週後ではとも
- 10 もに周囲との境界のない軟骨組織に修復されていた。播種群では移植4週後で、軟骨細胞が層状に配列しながら修復されているが、AB染色での染色は淡かった。移植12週後では、周囲の生体軟骨組織と同様に、完全な層状構造をとる軟骨組織で修復され、周囲組織との同化も良好であった。AB染色で濃染され、極めて良好な基質の産生を認めた(術後4週は図16A、術後12週は図16B)。
- 15 この片側開孔型PLGA移植担体は、細胞の播種が容易で、細胞を漏出させることなく円柱状に配列させて移植することができた。この細胞の配列構造を保って移植することが正常に近い軟骨再生を可能にすると考えられた。

また、実施例1-bの剥離法で作製したPLGA支持体を用いた実験も同様に実施し、塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

20

産業上の利用可能性

- 本発明により、細胞播種性、細胞保持性、及び、細胞の組織形成度に優れた生体適合性の三次元多孔性支持体の作製が可能となり、軟骨を始め種々の生体様組織の創製において優れた材料を提供することができる。また、この支持体を用い
- 25 て、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内で培養することにより得られる三次元細胞結合体は、生体移植時に炎症性の細胞の浸潤を防ぎ、周辺組織との適合性のある生体本来の組織に近い性質を有し、優れた組織形成度及び治療効果を示す。

請求の範囲

1. 孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上 $500\ \mu\text{m}$ 以下、孔長 $20\ \mu\text{m}$ 以上 $1\ \text{cm}$ 以下の縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造を有する組織再生用の三次元多孔性支持体。
2. 厚み方向に縦長な形状の孔が面方向に並列的に配置された概平板形状を有し、一方の面が開孔処理されているものである請求の範囲第1項記載の三次元多孔性支持体。
3. 生体適合性材料からなるものである請求の範囲第1又は2項記載の三次元多孔性支持体。
4. 生体適合性材料が、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸／グリコール酸共重合体、ポリ ϵ カプロラクトン及び乳酸／ ϵ カプロラクトン共重合体から選ばれる少なくとも1つを含んでなるものである請求の範囲第3項記載の三次元多孔性支持体。
5. 下記工程からなる請求の範囲第1項記載の三次元多孔性支持体の製造法：
- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を型枠に流し込んだ後、 3°C /分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去する。
6. 下記工程からなる請求の範囲第2項記載の三次元多孔性支持体の製造法：
- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を、概平板形状になるような型枠に流し込んだ後、 3°C /分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、
- d) 乾燥後の支持体を厚み方向の中心部で平板方向に剥離する。

7. 下記工程からなる請求の範囲第2項記載の三次元多孔性支持体の製造法:

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 概平板形状になるような型枠に粒状塩を分散させ、
- 5 c) 調製した溶液を前記型枠に流し込んだ後、3℃/分以上の冷却速度で凍結し、
- d) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、
- e) 粒状塩を水洗により除去する。

10 8. 粒状塩が無機塩及び/又は有機塩である請求の範囲第7項記載の三次元多孔性支持体の製造法。

9. 請求の範囲第1又は2項記載の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び/又は生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体。

15

10. 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が、骨、軟骨、靱帯、腱、血管、皮膚、脂肪、筋肉、神経、心臓、肝臓、脾臓、腸、腎臓、角膜、膀胱、尿管、尿道、乳房、骨髓又は臍帯血由来のものである請求の範囲第9項記載の三次元細胞結合体。

20 11. 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が、骨、関節軟骨、靱帯又は腱由来のものである請求の範囲第10項記載の三次元細胞結合体。

12. 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が、骨髓、脂肪、肝臓又は臍帯血由来のものである請求の範囲第10項記載の三次元細胞結合体。

25

13. 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が、間葉系幹細胞である請求の範囲第10項記載の三次元細胞結合体。

14. 請求の範囲第7項記載の方法で製造した三次元多孔性支持体に、組織由

来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体であって、生体軟骨の1／10以上の圧縮弾性率を有する三次元細胞結合体。

- 5 15. 請求の範囲第7項記載の方法で製造した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内及び／又は生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体であって、開孔処理側あるいは非開孔処理側からの厚みが全体の厚みの1％から90％の範囲で生体軟骨により近い組織構造を有する三次元細胞結合体。

10

16. 請求の範囲第1又は2項記載の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内及び／又は生体内で培養することからなる三次元細胞結合体の製造法。

- 15 17. 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が、あらかじめ三次元環境下で1時間から48時間静置培養されたものである請求の範囲第16項記載の三次元細胞結合体の製造法。

18. 人工環境内の培養が、アスコルビン酸存在下で行われることからなる請求の範囲第16又は17項記載の三次元細胞結合体の製造法。

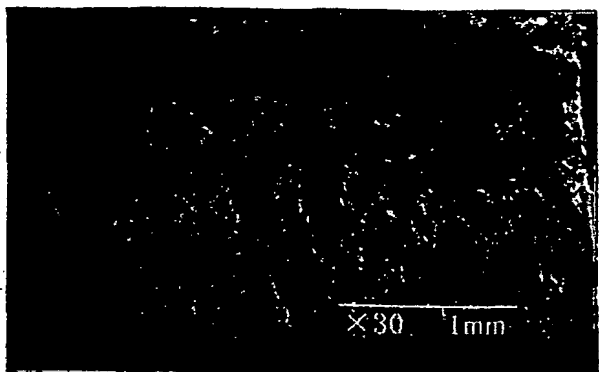
20

19. 人工環境内の培養が、培養液を支持体に対し毎秒0.1cmから毎秒50cmの速度で移動させる条件で行われることからなる請求の範囲第16～18項のいずれかに記載の三次元細胞結合体の製造法。

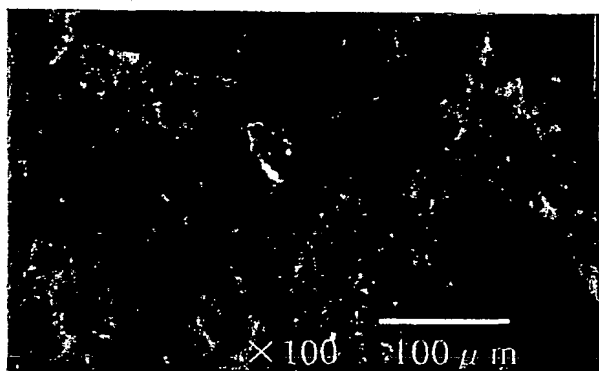
25

20. 請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の三次元多孔性支持体、又は、請求の範囲第9～15項のいずれかに記載の三次元細胞結合体を、生体内に移植することによる軟骨損傷の治療方法。

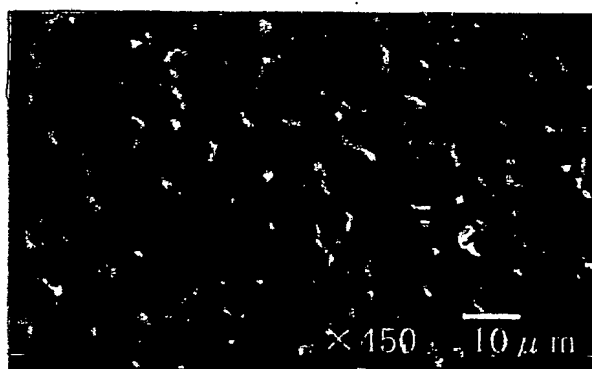
図 1



断面



開孔側



非開孔側

図 2B

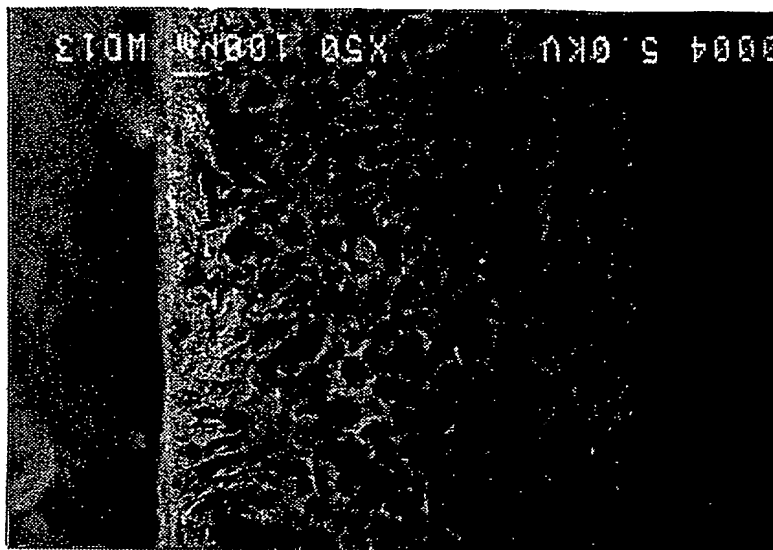


図 2A



図 3

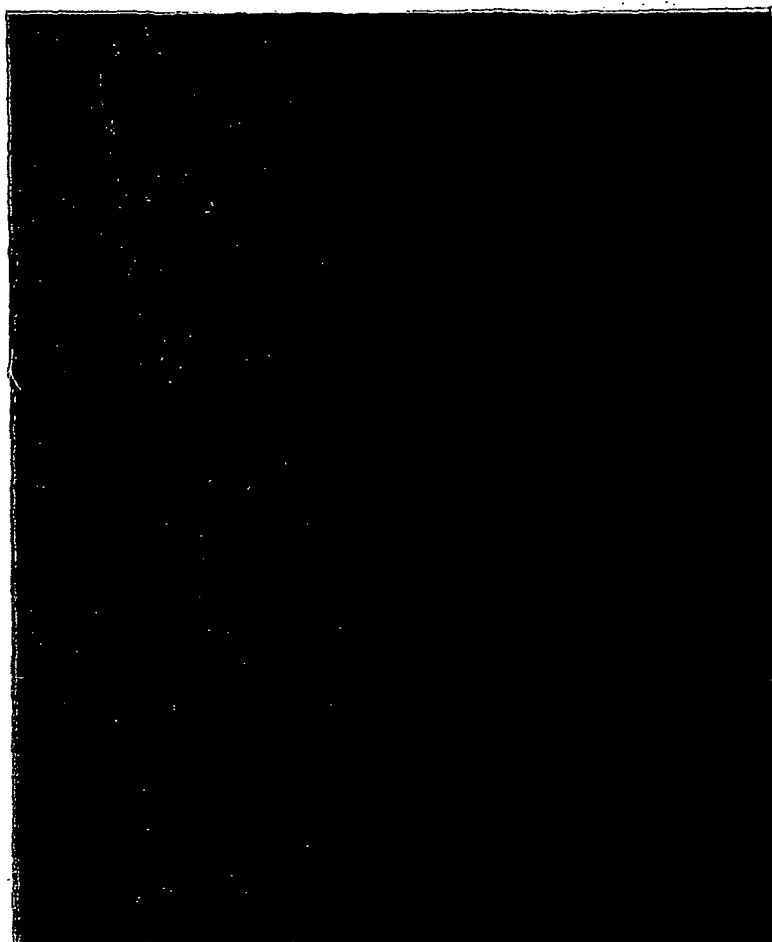


図 4

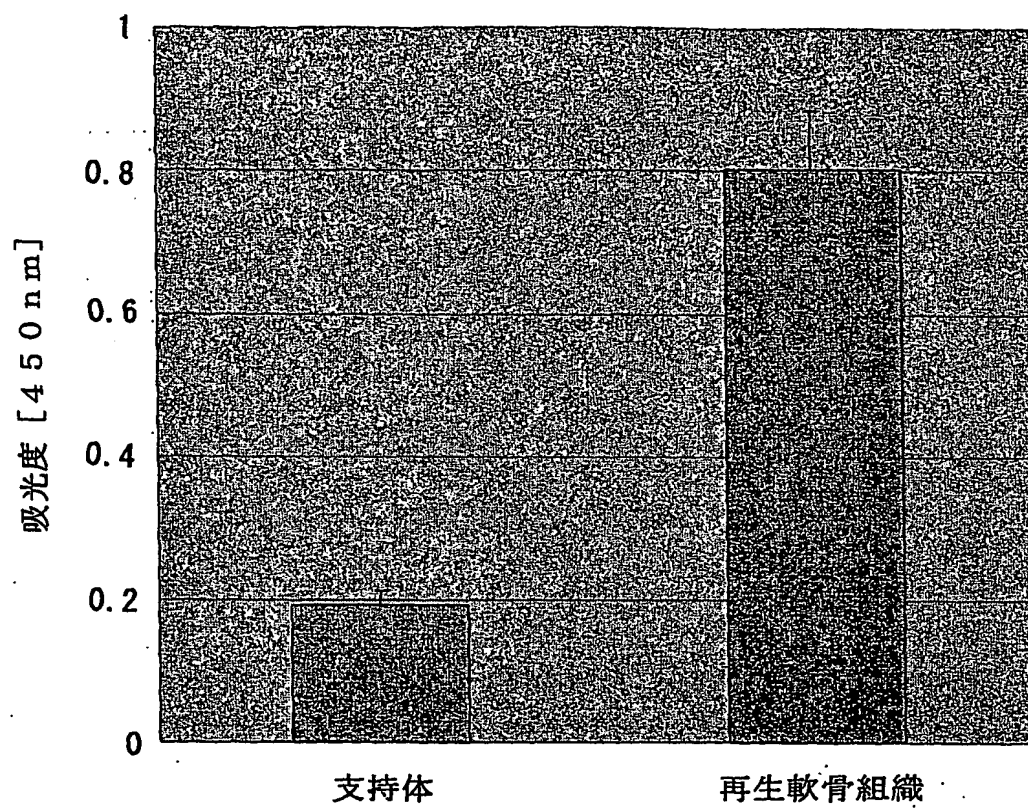


図 5

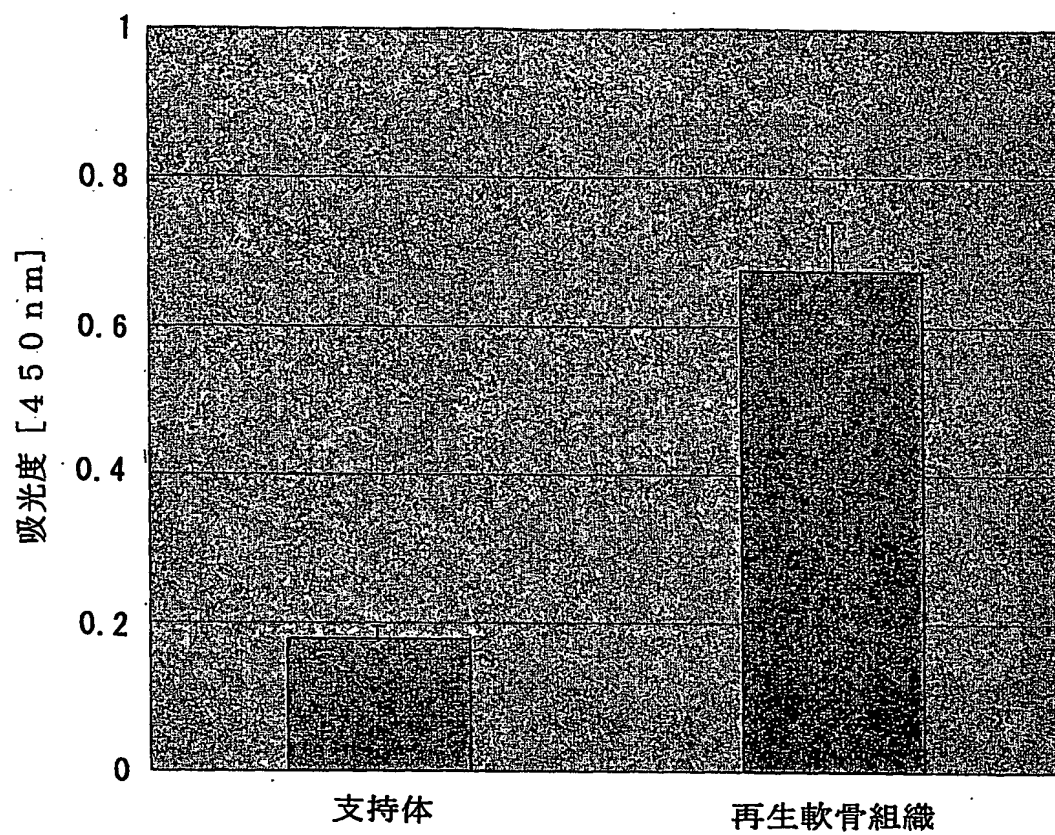


図 6

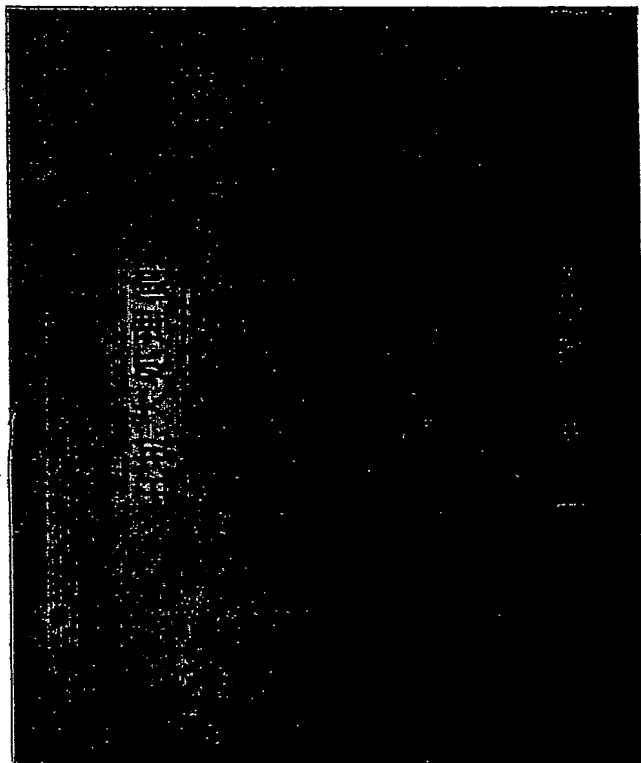


図7

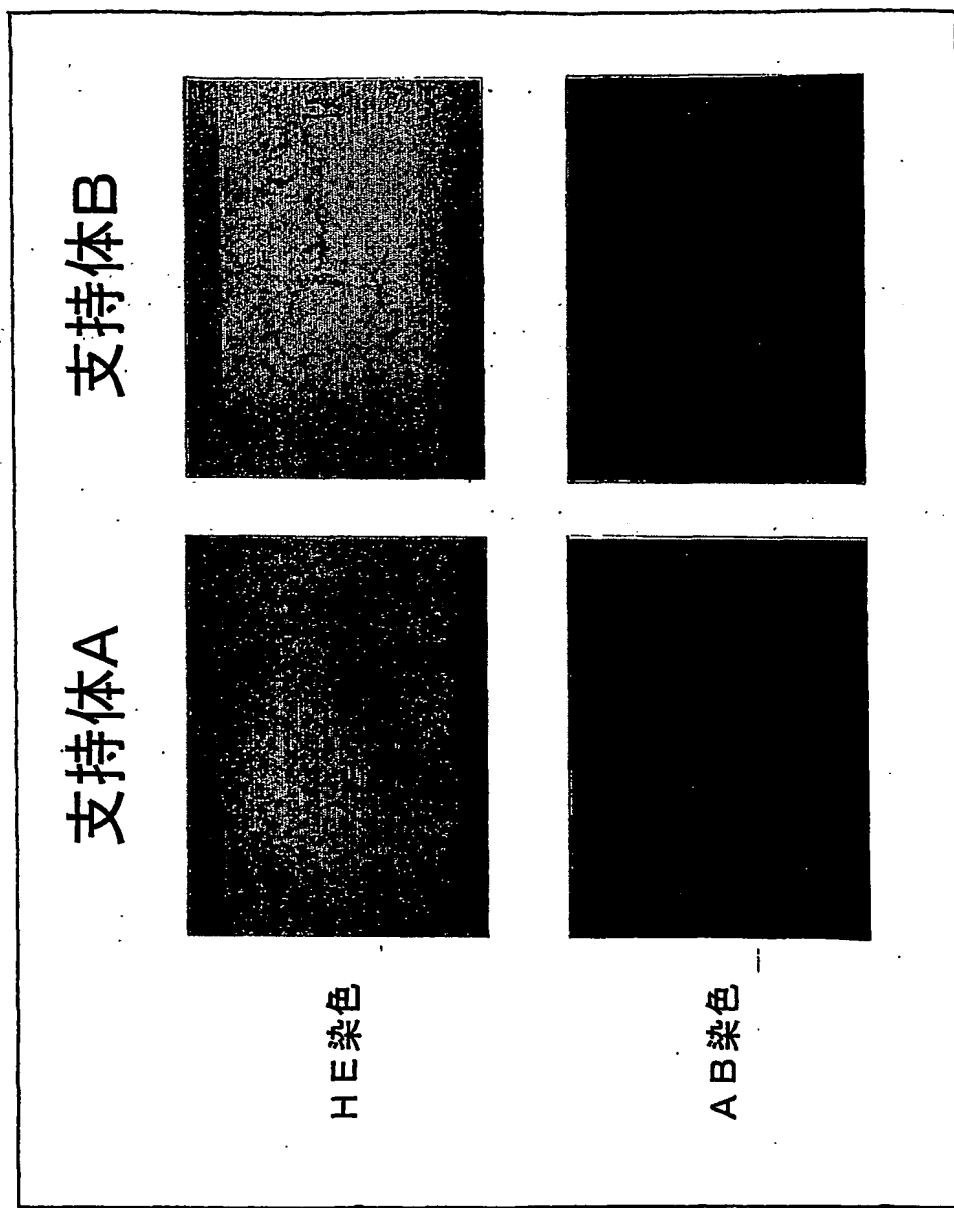


図 8 B

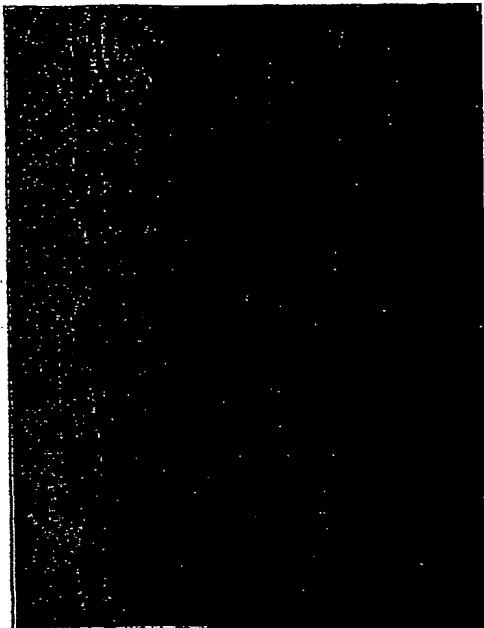


図 8 A

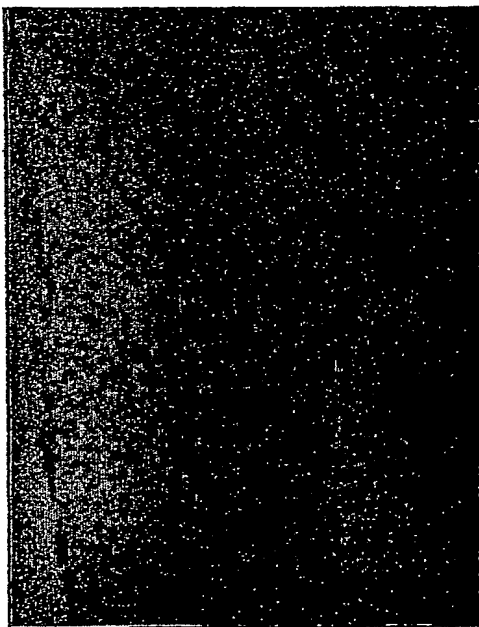


図9B

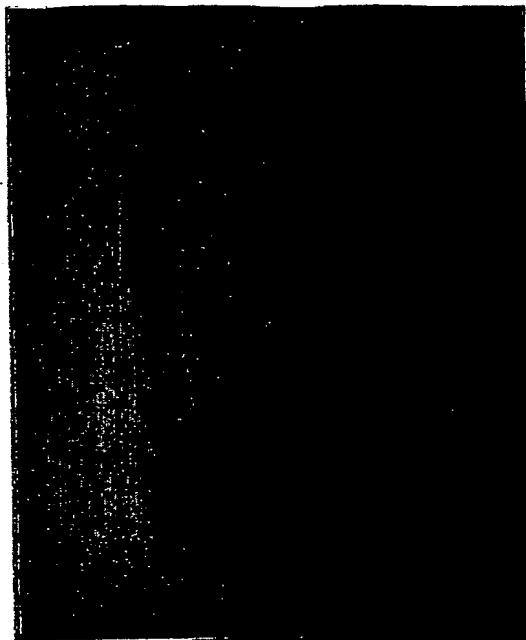


図9A



10/17

図 10

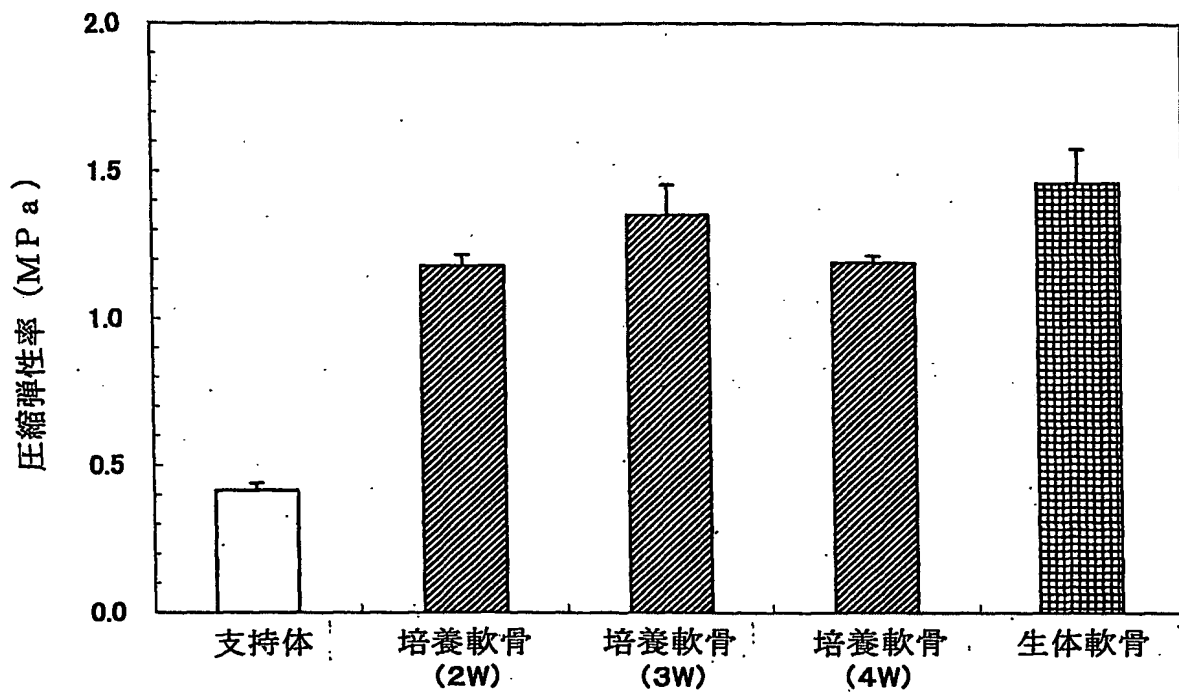


図 11



図 1 2

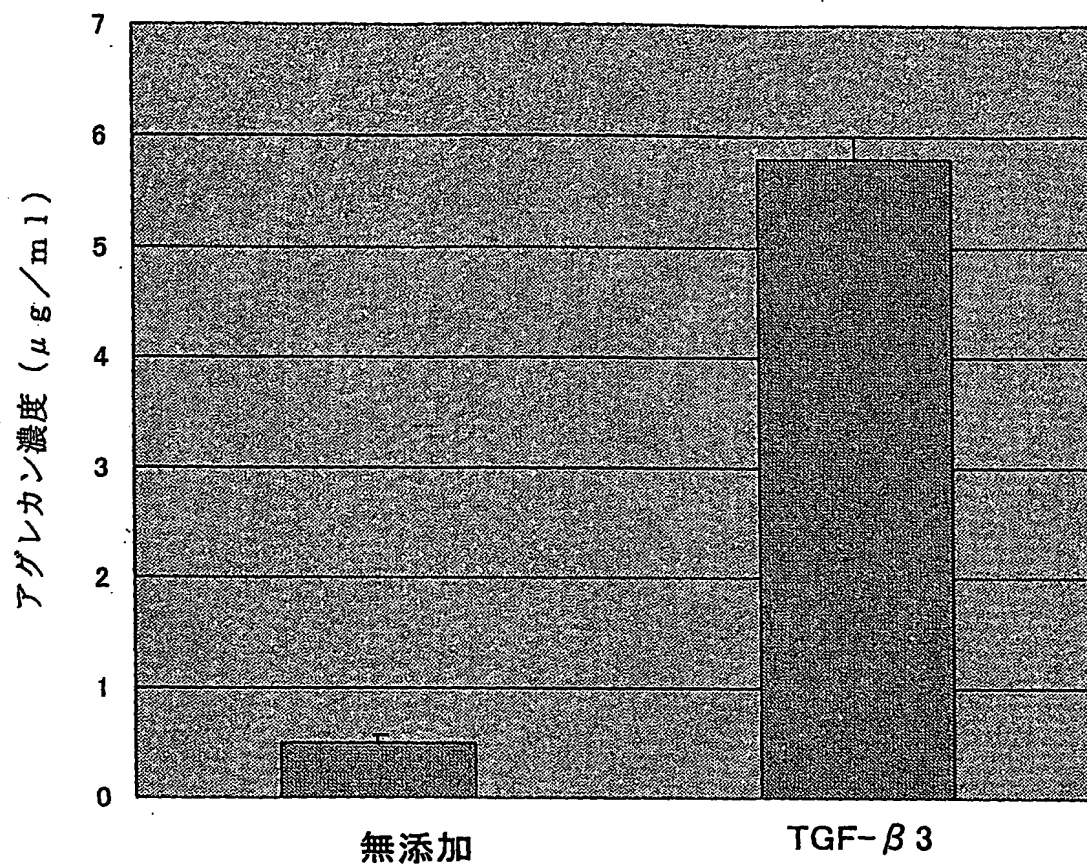


図13

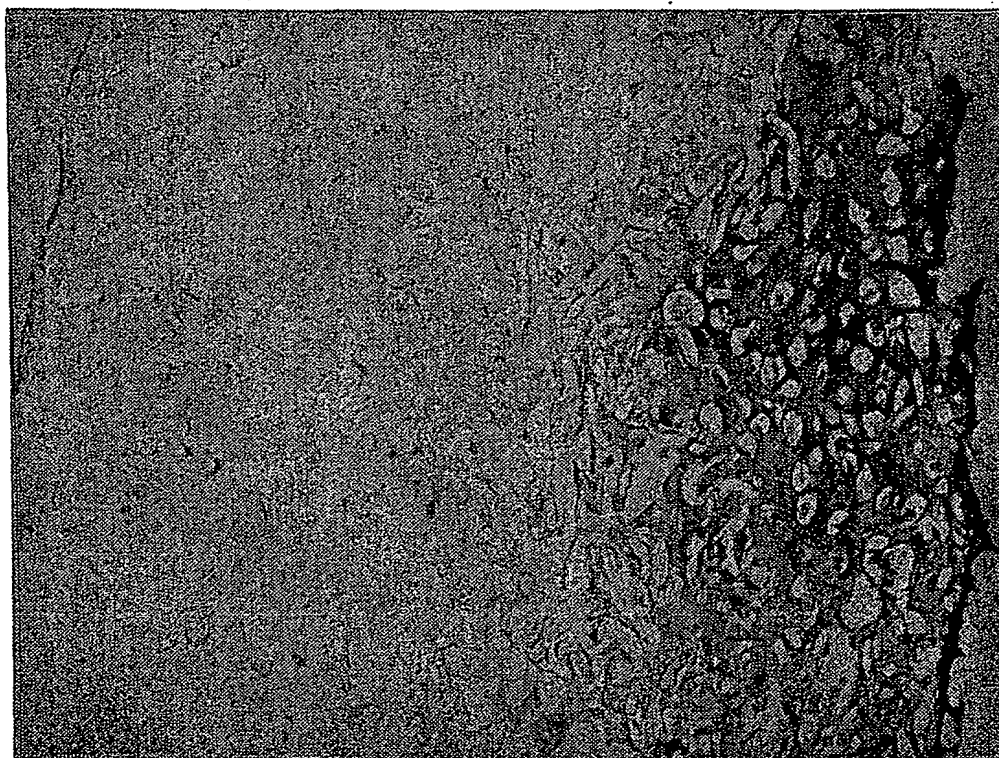


図 1 4

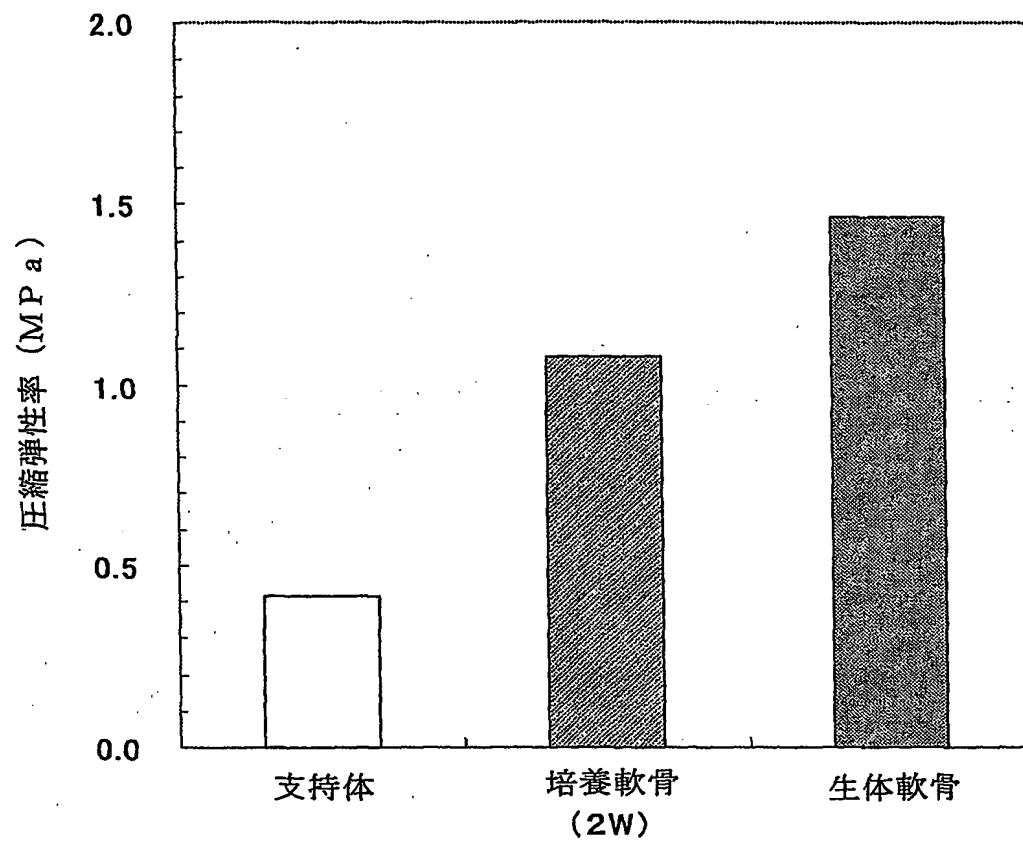


図 15

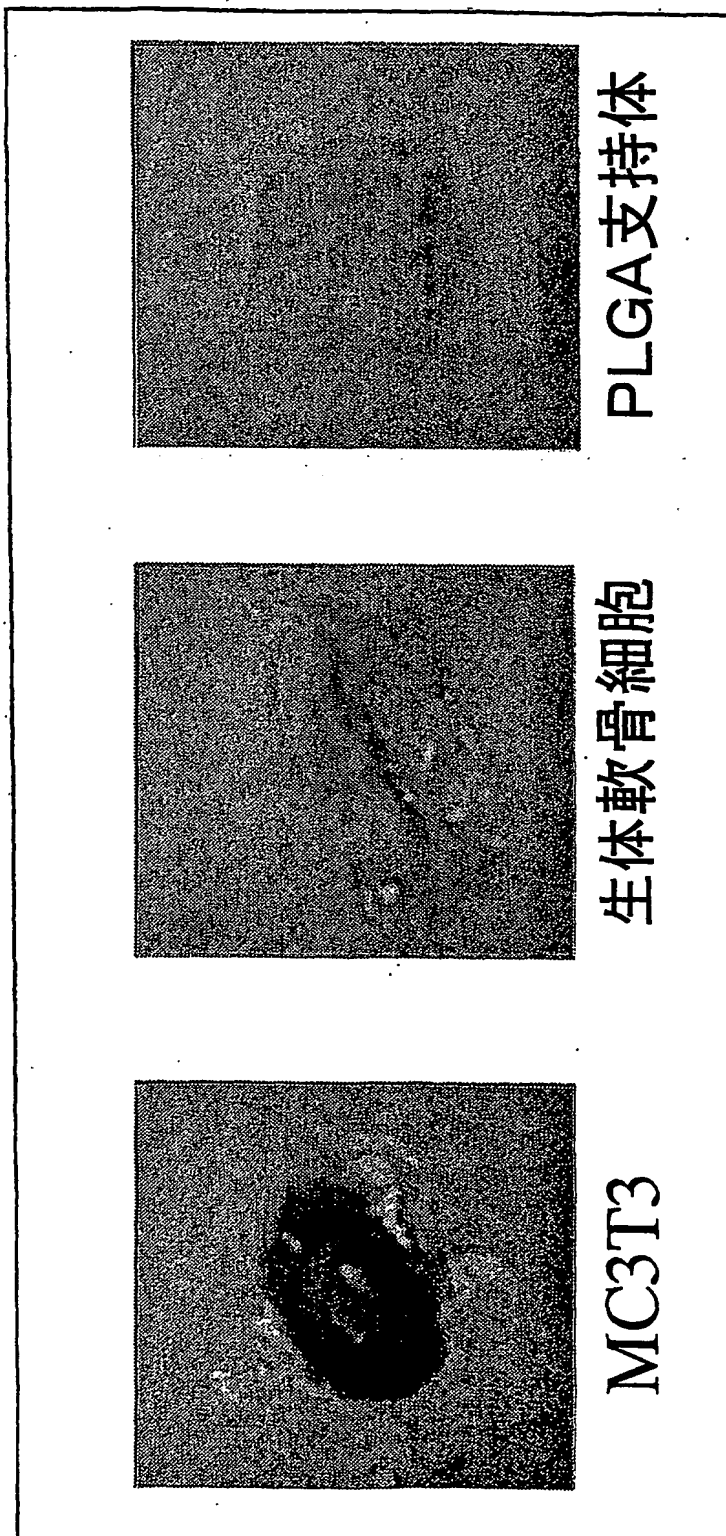


図 16A

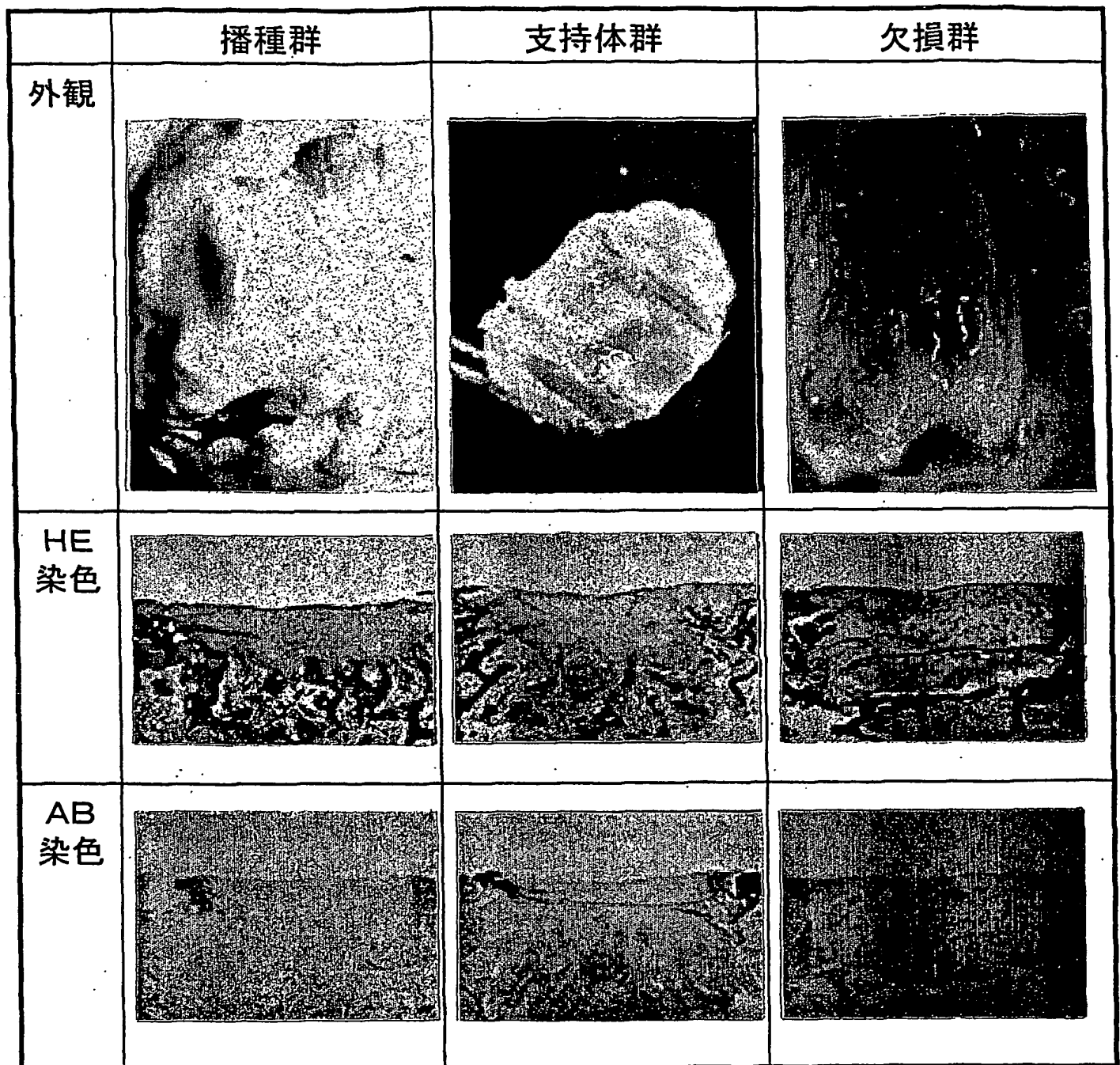
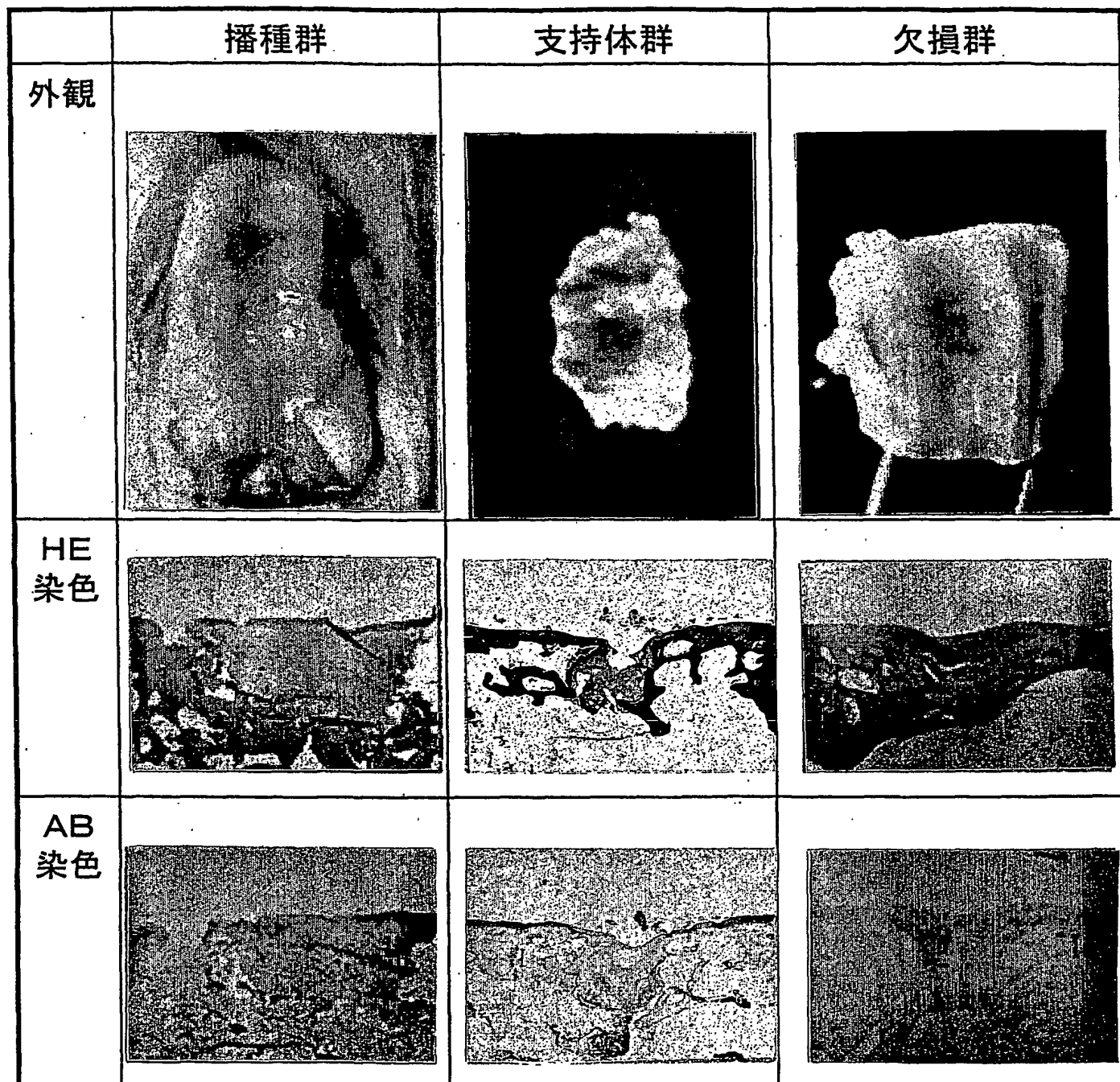


図 1 6 B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/56, C12M3/00, C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L27/00-60, C12M1/00-3/10, C12N1/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	EP 1234587 A1 (ETHICON INC.), 28 August, 2002 (28.08.02), & JP 2002-291867 A	1-4, 9-12, 16, 17/5-8, 13-15, 18, 19
Y/A	WO 00/62829 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY), 26 October, 2000 (26.10.00), & JP 2002-541925 A & EP 1173235 A1 & US 6337198 B1	1-13, 16-19 /14, 15
A	EP 747068 A1 (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL INC.), 11 December, 1996 (11.12.96), & JP 09-099051 A & US 5869080 A	1-19
A	JP 2000-189510 A (KYOCERA CORP.), 11 July, 2000 (11.07.00), (Family: none)	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 January, 2004 (06.01.04)

Date of mailing of the international search report
03 February, 2004 (03.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11471

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention according to claim 20 relates to "a method of treating injured cartilage" and thus pertains to methods of treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61L27/56, C12M3/00, C12N5/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61L27/00-60, C12M1/00-3/10, C12N1/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	EP 1234587 A1 (ETHICON INC.) 2002.08.28 & JP 2002-291867 A	1-4, 9-12, 16, 17/5-8, 13-15, 18, 19
Y/A	WO 00/62829 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY) 2000.10.26 & JP 2002-541925 A & EP 1173235 A1 & US 6337198 B1	1-13, 16-19 /14, 15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.01.2004

国際調査報告の発送日

03.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 747068 A1 (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL INC.) 1996.12.11 & JP 09-099051 A & US 5869080 A	1-19
A	JP 2000-189510 A (KYOCERA CORP.) 2000.07.11 (ファミリーなし)	1-19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲20に係る発明は「軟骨損傷の治療方法」であり、人の身体の治療による処置方法に該当する。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.